

Immunelektrophoretische Versuche
zum Nachweis von
Desoxyribonucleaseaktivitäten aus
Micrococcus pyogenes var. *aureus* (SAB).

von

GERTRUD RAUSCH

Frankfurt/M. 1963

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität

Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. K. H e r z b e r g

Immunelektrophoretische Versuche zum Nachweis
von Desoxyribonucleaseaktivitäten aus
Micrococcus pyogenes var. *aureus* (SAB).

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Zahnmedizin

der hohen Medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Gertrud Rausch

aus Secovce

Frankfurt/M. 1963



Dekan: Prof. Dr. W. Krücke

Referent: Prof. Dr. A. K. Kleinschmidt

Korreferent: Prof. Dr. A. Wacker

Mündliche Prüfung: 13. September 1963

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</u>	3
II. <u>EXPERIMENTELLES</u>	6
1. Seitherige Befunde über die DNase-Aktivitäten.	
2. Eigene Versuche:	7
a) DNase-Gewinnung aus dem Staphylococcus-aureus (SAB)	
b) Die DNA-Platte	8
c) Toxine und Enzyme der Staphylokokken als Antigen	9
d) Ouchterlony-Plattentest	10
e) Immunelektrophorese	11
f) Die Kombination der Immunelektrophorese mit dem DNase-Nachweis mit Hilfe der DNA-Platte	13
III. <u>DIE ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN</u>	14
IV. <u>DISKUSSION</u>	35
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	38
<u>LITERATUR</u>	39

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Unter den Enzymen, die beim *Staphylococcus aureus*, (Kolle, Hetsch, Schloßberger 1952, Wilson und Miles 1955, Grün 1958, Otte 1961) als dem banalen Eitererreger gefunden wurden, haben die zellzerstörenden schon frühzeitig Bedeutung erlangt. Sind doch die Keime schon durch ihr besonderes morphologisches Verhalten bei Eiterprozessen, durch ihren Angriff auf Leukozyten und deren Umwandlung in " Eiterzellen ", ausgezeichnet. Dabei erkennt man meist mit der aktiven Aufnahme der Keime (Phagozytose), daß beim Fortschreiten der bakteriellen Intoxikation der Leukozyten der Kern verändert, verklumpt, färberisch schwach tingiert ist und in späteren Stadien ganz zerfällt. Diese Kernveränderungen benötigen einen enzymatischen oder toxischen Eingriff in das Zellgefüge durch Bakterientoxine. Der Um- und Abbau der Kernstruktur wird vor allem der Desoxyribonuclease (DNase) zugeschrieben, die in letzten Jahren ausführlicher untersucht wurde. (Weckman und Catlin 1957, Catlin und Cunningham 1958, Cunningham 1959)

In den Staphylokokken sind seither folgende Toxine beschrieben worden.

1. Das eigentliche Exotoxin der Staphylokokken besteht aus dem thermolabilen Hämolsin (Elek und Levy (b) 1950, Elek¹ 1959) und einem Faktor, der bei subcutaner Injektion eine Nekrose der Haut verursacht, dem Dermonekrotoxin. (Delaunay und Lasfargues 1945, Elek² 1959) Der Nachweis der Hämolsine wird auf der Blutplatte und im Reagenzglas erbracht.

Manche Staphylokokkenstämme produzieren ein thermostabiles Enterotoxin, das selbst durch 30 Minuten langes Kochen nicht zerstört wird. Es verursacht Nahrungsmittelvergiftungen (Erbrechen, Diarrhöe) bei dem Genuß kohlenhydratreicher Nahrungsmittel, in denen enterotoxinbildende Staphylokokken gewachsen sind. Die Mehrheit der enterotoxinbildenden Stämme gehört zwei von Allison 1949 untersuchten Phagentypen an. (Joiris 1953, Pöhn 1955 und 1957, Elek³ 1959)

Die Gelatinase führt zur Verflüssigung von Gelatinekulturen. Es konnte bisher keine Beziehung zwischen der Gelatinaseproduk-

tion, der Hämolyisinbildung und der Virulenz der Staphylokokken erbracht werden. (Richou 1952, Elek⁴ 1959)

2. Unter den definierten Enzymen sind folgende bekannt:

Staphylokokken-Koagulase (Elek⁵ 1959), die Plasma zur Gerinnung bringt, ist hitzestabil, widerstandsfähig gegen chemische Mittel und wurde als Protein identifiziert. Der tatsächliche Blutgerinnungsfaktor Koagulase-Thrombin wird beim Gerinnungsprozeß nicht aufgebraucht. Es wird angenommen, daß die Koagulase am Fibrin haftet und durch Auflösung dieses Fibrins wieder gewonnen werden kann. (Duthie und Lorenz 1950) Die Koagulase wirkt wie das Thrombin auf das Fibrinogen ein, sie unterscheidet sich vom Thrombin, indem sie durch Hirudin und Heparin nicht gehemmt wird. Der Koagulaseanstieg bei verschiedenen Stämmen in vitro zeigt keine Beziehung zur Virulenz bei menschlichen Infektionen. Infektionen bei lokalen Verletzungen oder ernste Systemerkrankungen können verursacht werden durch Staphylokokken mit hoher, mittlerer oder niedriger Koagulaseaktivität. (Tager und Hales 1947) Der Fibrinniederschlag auf der Oberfläche der Kokken bedeutet nicht mehr als ein zeitlich begrenzter Widerstand gegen die Phagozytose durch Leukozyten und Histiozyten und macht Bakterien unfähig sich zu vermehren und Toxine zu produzieren. Die Koagulase wird in vitro durch proteolytische Fermente des Serums gelöst und ein ähnlicher Vorgang spielt sich auch in vivo ab. Die Ansicht, daß sich die pyogenen Staphylokokken von den auf der Haut saprophytär lebenden ableiten, indem sie nach Eindringen in den Organismus Koagulase als ein schützendes Agens bilden, muß als reine Hypothese betrachtet werden. (Darányi 1955) Die Lipase ist hitzestabil, ihre optimale Aktivität liegt bei pH = 7,2. (Michaelis und Nakahara 1923) Den Antigennachweis der Lipase erbrachte Elek und Levy mit der zweidimensionalen Diffusionsmethode. (Elek⁶ 1959) Im Hinblick auf die pathogenen Eigenschaften hat die Lipase gegenwärtig noch keine Bedeutung. Die Hyaluronidase spaltet die hochpolymeren Hyaluronsäuren des Gewebes und verhilft so den Bakterien zu einer schnellen Ausbreitung (spreading factor). Neben dem bevorzugten Vorkommen bei Streptokokken findet man das Enzym auch bei Staphylokokken. Es wird produziert von nahezu allen koagulasepositiven Stämmen. (Kaffka 1957, Elek⁷ 1959)

Die Beschreibung der Enzymeigenschaften der Staphylokokken zeigt deutlich, daß diese Bakterien hauptsächlich durch ihre Enzyme wirken.

In neuerer Zeit wurde eine Staphylokokken-Desoxyribonuclease (DNase) beschrieben und näher charakterisiert.

Cunningham, Catlin und Privat de Garilhe (1956) untersuchten als erste die DNase-Aktivität des *Staphylococcus aureus* (Stamm SAB). Es handelt sich hierbei um eine sogenannte Endonuclease, das heißt, um ein Enzym, das die langfädigen Makromoleküle der Desoxyribonucleinsäure (DNA) durch Querbrüche zu depolymerisieren vermag. Dabei ist nicht ausgeschlossen, daß auch an ihren Enden ein Abbau erfolgt. Im Gegensatz zu einer DNase I aus Rinderpankreas liefert z.B. diese sogenannte DNase II neben größeren Bruchstücken beim Abbau des DNA-Moleküls 3' mononucleotide, sowie Oligonucleotide. (Alexander, Heppel und Hurwitz 1961)

Die bisher angewandten Methoden zur Bestimmung dieser DNase-Aktivitäten sind im wesentlichen:

- a) die Messung der Viskositätsänderung der DNA-Lösung bei Vorhandensein von DNase (z.B. Catlin und Cunningham 1958),
- b) die Änderung der UV-Absorption der DNA,
- c) die Messung der DNase-Aktivität durch Diffusion in einem DNA-haltigen Agar (Heinecke und Venner 1958).

Bei der Kombination mit der Immunelektrophorese und dem Enzymnachweis waren weitere Befunde zu erwarten. Die Immunelektrophorese stellt ein Verfahren dar, durch einen ersten Schritt die Trennung von Proteingemischen durch Wanderung im elektrischen Feld zu erreichen. Der zweite Schritt gibt eine Präzipitationsreaktion mit spezifischem Antiserum gegen das elektrophoretisch aufgetrennte Protein, das in geeigneter Weise im Agargel an die aufgegliederten Proteine herangebracht wird. Die vorliegende Untersuchung befaßt sich mit den Fragen, ob es möglich ist

- a) Staphylokokkenbestandteile elektrophoretisch aufzutrennen und durch die Immunelektrophorese nachzuweisen,
- b) die DNase-Aktivitäten eines bestimmten Stammes SAB mittels DNA-haltigem Agar qualitativ nachzuweisen,
- c) die erhaltenen Fraktionen in Verbindung mit DNase-Aktivitäten zu bringen.

II. EXPERIMENTELLES

1. Seitherige Befunde über die DNase-Aktivitäten.

Die vom SAB-Stamm produzierte DNase wird optimal aktiviert bei einer Konzentration von $0,01 \text{ m Ca}^{++}$ an Stelle von Mg^{++} . Der isoelektrische Punkt beträgt nach der Dialyse 8,6; das bedeutet, daß in dem genügend gereinigten Protein ein geringer Überschuß an basischen Gruppen der Aminosäuren vorhanden ist. Durch die Zugabe von Aethylendiaminotetraacetat wird dieses Enzym nicht gehemmt; beim Erhitzen auf 95°C (15 Minuten) in Gegenwart der Bakterienzellen verliert es nicht seine Aktivität. (Rogers 1961)

Die DNase des *Micrococcus pyogenes* depolymerisiert die fädigen Makromoleküle der DNA und liefert (unter anderen Produkten) Oligonucleotide und Mononucleotide mit der 3'Phosphatstellung. Die niedrigen Bruchstücke der DNA sind in Wasser und Säuren löslich. Die 3'mononucleotide entstehen durch die gemeinsame Wirkung der DNase und der Phosphordiesterase, ganz im Gegensatz zu anderen DNase-Präparaten, wie Pankreas DNase I, die 5'mononucleotide liefert.

Das Enzym, gewonnen aus einem Wachstumsmedium des *Micrococcus pyogenes* wurde, über eine Ammoniumsulfat- und Trichloressigsäurefraktion 500fach gereinigt. Der Sedimentationskoeffizient der DNase beträgt ungefähr 1,8 s und dies entspräche einem Molekulargewicht von etwa 12000.

Catlin und Cunningham untersuchten die Beziehungen zwischen der DNase-Aktivität und der Ansammlung von DNA-haltigem Schleim in dem Kulturmedium brain - heart - infusion (Difco) des *Staphylococcus aureus* SAB mit hohem Natriumchloridgehalt. Der DNA-haltige Schleim verschwand bei ansteigendem pH-Wert bis 8 und bei Zugabe von Ca^{++} . Die geschüttelten Kulturen hatten anscheinend einen ausreichenden DNase-Gehalt, um die Ansammlung von DNA-Schleim zu verhindern. Ebenfalls keine Schleimansammlung fand man bei den ungeschüttelten Kulturen, die einen schwach alkalischen pH-Wert von 7,6 und eine hohe Calciumionenkonzentration besaßen. In allen anderen ungeschüttelten Kulturen mit 1 molarem Natriumchlorid sammelten sich große Schleimmassen an. Die Abwe-

senheit von DNA-Schleim bedeutet nicht, daß der Staphylococcus keine DNA produziert, sondern daß unter den vorhandenen Kulturbedingungen die hohe DNase-Aktivität sehr wahrscheinlich zur Depolymerisierung der sich bildenden DNA führte.

2. Eigene Versuche:

a) DNase-Gewinnung aus dem Staphylococcus-aureus (SAB)

Die DNase wurde nach einer Modifikation des Verfahrens von Cunningham und Catlin gewonnen. Als Kulturmedium diente ebenfalls brain - heart - infusion (Difco).

Angaben der Hersteller:

Bestandteile	Infusion from calf brains	200
	Beef Heart	250
	Proteose - Peptone, Difco	10
	Bacto - Dextrose	2
	Natriumchlorid	5
	Dinatriumhydrogen-Phosphat	2,5
	H ₂ O	ad 1000

Zu diesem Nährboden gibt man 53,5 g Natriumchlorid hinzu, um eine 1 molare Lösung zu erhalten. Natriumchlorid hemmt die Aktivität dieser DNase. Der mit dem Keim beimpfte Nährboden wächst im Chemostat unter ständiger Belüftung und Zulauf von Nährboden und Ablauf von zellreichem Kulturmateriail 48 Stunden bei 37°C. Nach dem Bebrüten zeigt das gelbbraune, trübe Kulturmedium schleimige Fäden, die die polymerisierte DNA enthalten. Die Aufschließung der Staphylokokken kann mit verschiedenen Verfahren durchgeführt werden.

1. Zertrümmerung mit Glasperlen.
2. Zelldestruktion im Homogenisator.
3. Durch Frieren und Auftauen. Das letzte Verfahren wurde bei unseren Versuchen angewandt.

Das Homogenat wird gefroren (- 20°C) und wieder aufgetaut. Durch diesen Vorgang des Gefrierens und Auftauens kommt es zu einer partiellen Zertrümmerung der Bakterien und damit zur Freigabe der auch intrazellulär gebundenen DNase. Anschließend wird dem Homogenat Aceton unter Rühren zugesetzt, um eine Proteinpräzipitation zu gewinnen.

1 Vol. (3 l) Homogenat 1°C
 + 1,5 Vol. auf 10°C abgekühltes Aceton unter Rühren zugeben;
 es erfolgt ein Temperaturanstieg auf unge-
 fähr $+ 10^{\circ}\text{C}$ (Lösungswärme).

2,5 Vol. (ca - 5°C) 1 Stunde stehen lassen.
 Der DNA-haltige Überstand wird nach dem Abzentrifugieren ver-
 worfen. Das Sediment wird mit physiologischer Natriumchlorid-
 lösung (NaCl) im Verhältnis 1:1 resuspendiert und kräftig umge-
 rührt. Ein Teil der reversibel gefällten Proteine geht in Lö-
 sung. Die Suspension wird 12 Stunden lang im Kühlschrank aufbe-
 wahrt und anschließend zentrifugiert. Die über dem Sediment be-
 findliche braune Flüssigkeit wird für alle weiteren Versuche
 benutzt.

b) Die DNA-Platte

Eine Nähragarplatte, die DNA enthält, diente zur Feststellung
 der DNase-Aktivität aus der oben beschriebenen braunen Flüssig-
 keit.

	1,5 g Bacto-Agar
	2 g Caseinhydrolysat
	1 g Glucose
	9 ml 0,5 molares MgCl_2
	1 ml 0,5 molares CaCl_2
	<u>9 ml 0,1 molarer Trispuffer pH=7,4</u>
ad	100 ml aqua bidest.

Die Nährlösung (pH=7,4) wird 20 Minuten im Dampftopf sterili-
 siert. Nach dem Erhitzen stellt sich ein pH-Wert von 7,3 ein.
 8 ml Nähragar und 2 ml DNA-Lösung (0,5%ige Seelachs DNA^x in
 0,145 mol. Natriumchlorid) (Kleinschmidt und Zahn 1958) werden
 in einem sterilen Reagenzglas gemischt und im Wasserbad 15 Mi-
 nuten auf nahezu 100°C erhitzt (weil die DNA nicht steril ge-
 wonnen und abgewogen ist). Der flüssige DNA-haltige Agar wird
 in eine sterile plane Petrischale gegossen. Diese Nähragar-
 platte mit 0,1% DNA-Zusatz (DNA-Platte) wird zum Nachweis der
 DNase-Aktivitäten benutzt.

^x Präparat 1865 wurde von Prof.Dr.R.K.Zahn dankenswerterweise
 zur Verfügung gestellt.

Wir bedienten uns drei verschiedener Verfahren, um die DNase-haltige Flüssigkeit auf die DNA-Platte einwirken zu lassen.

1. Zunächst werden in der DNA-Platte Löcher ausgestanzt und in jedes Loch 0,05 ml der auf ihre DNase-Aktivität zu untersuchenden Substanz pipettiert.
2. In einem anderen Versuch werden Agarblöckchen (Größe 9 mal 4,5 mm, Höhe 1,5 mm), die vorher 15 Minuten mit UV zur Erreichung von Keimfreiheit bestrahlt wurden, (Sterisolbrenner mit Reflektor in 80 cm Abstand $1000 \frac{\text{erg}}{\text{min} \cdot \text{mm}^2}$), mit einer ausgeglühten Öse auf die DNA-Platte gelegt. Auf jedes dieser Agarblöckchen wird 0,01 ml DNase-haltige Lösung pipettiert, die auch in ähnlicher Weise mit UV bestrahlt wurde.
3. Der Nachweis der DNase-Aktivität gelingt ebensogut, wenn man die Agarschicht (siehe Seite 13, f), in der das zu untersuchende Material zuerst elektrophoretisch aufgetrennt wurde, in Blöckchen von der gleichen Größenordnung teilt und nach der UV-Bestrahlung auf die DNA-Platte legt zur Prüfung etwa vorhandener DNase-Aktivität im DNA-Agar.

Zum Nachweis der DNase-Aktivität standen die DNA-Platten entweder 18 Stunden im Brutschrank bei 37°C oder bei Zimmertemperatur. Die auf ihre DNase-Aktivität zu untersuchende Flüssigkeit diffundiert von den ausgestanzten Löchern oder den aufgelegten Agarblöckchen in den DNA-haltigen Agar und hydrolysiert die DNA. (Siehe Abb.1, 2, 10a, 10b, 10c) Die Platte wurde dann mit 10 ml 1-normaler Salzsäure übergossen und nach 5 Minuten mit aqua bidest.nachgewaschen. Intakte DNA wird durch die Salzsäure im Agar präzipitiert. Es erscheint der Bezirk, in dem die DNA depolymerisiert wurde, dann als durchsichtiger, runder oder ellipsenförmiger Hof im Gegensatz zu dem trüben DNA-haltigen Agar.

c) Toxine und Enzyme der Staphylokokken als Antigen

Die DNase-haltige Lösung, gewonnen aus dem Staphylococcus aureus SAB, wurde als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen benutzt.

Zahlreiche Arbeiten weisen hin, daß die Toxine und Enzyme des Staphylococcus antigen sind. (Elek und Levy (a) 1950, Rountree und Barbour 1952, Oeding 1953, Surgalla, Bergdoll und Dack 1954,

Turpin u.a. 1954, Stern und Elek 1957, Crowle¹ 1961, Borenfreund und Bendich 1961)

Die Antigene regen nach intravenöser, intramuskulärer oder subcutaner Injektion in gewissen Körperzellen, vor allem im RES., die Bildung von spezifisch homologen Antikörpern an. Die Antikörper gehören der γ -Globulinfraktion des Serums an, ihr Molekulargewicht liegt in der Größenordnung von 150000 bis 180000. (Schmidt 1955, Grabar 1958)

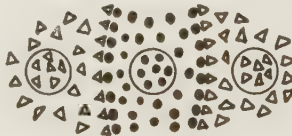
Für orientierende Angaben wurden für die Versuche zum Nachweis spezifischer Antigene die Präzipitationsreaktion mit dem Plattentest nach Ouchterlony und die Immunelektrophorese (Mikroreaktion in der Modifikation nach Scheidegger) benutzt. (Scheidegger 1955, Hitzig 1960, Steigerwald, Spielmann, Fries und Grebe 1960)

d) Ouchterlony-Plattentest

In eine Petrischale werden 10 ml eines in Michaelispuffer pH=8,2 verflüssigten Agars (1%) gegossen.

Michaelispuffer pH=8,2 :	10,0 g	Veronalnatrium
	6,5 g	Na-acetat
	60,0 ml	n/10 HCl
	ad 1000,0 ml	aqua dest.

1 g Agar und 100 ml Michaelispuffer werden 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert.



Darstellung nach Hitzig

In die beiden äußeren ausgestanzten Löcher pipettiert man 0,05 ml der als Antigen wirksamen SAB-DNase-haltigen Lösung, in das mittlere Loch die gleiche Menge des entsprechenden Antiserums. Die Antigene und das Immunserum diffundieren in das Agargel und bilden ein Präzipitat, das in den Maschen des Gels festgehalten wird. Jedes Antigen-Antikörpersystem bildet für sich eine einzige Linie mit einem bestimmten von der Diffusion abhängigen Aussehen. Während der Aufbewahrung der Petrischale für mindestens 3 Tage

bei 4°C bildeten sich dann Präzipitationslinien aus, die sich bei längerem Aufbewahren verstärkten. (Crowle² 1961)

e) Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese ist auf der Agardiffusionstechnik aufgebaut. Es handelt sich um eine Kombination von Elektrophorese mit der zweidimensionalen Diffusion. Die im elektrischen Feld diffundierenden Antigene zeigen einmal ihren Ladungscharakter und ihre Größe, zum anderen ihre immunologische Reaktionsweise, indem sie mit den homologen Antikörpern opake, konvex zum Kanal verlaufende Präzipitationslinien im transparenten Gel bilden. Jeder Präzipitationslinie entspricht ein immunologisch homogenes gleichartiges Antigen-Antikörpersystem. " Die Zahl der Antigen-Komponenten ist schließlich gleich der Zahl der sichtbaren Präzipitationslinien "; nach Oudin. (Grabar und Williams 1953, Williams und Grabar 1955, Wuhrmann und Wunderly 1957, Wunderly 1958, Wunderly und Bustamante 1958, Wunderly 1960, Hirschfeld 1960, Grabar und Burtin 1960, Crowle³ 1961)

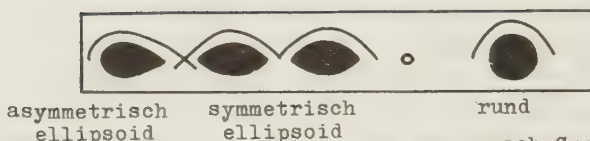
Versuchsansatz für die Immunelektrophorese

(Schultze und Schwick 1957)

Von einer 1%igen auf 80°C erhitzten flüssigen Agarlösung in Michaelispuffer pH=8,2 werden 2 ml auf einen gut gereinigten Objektträger (7,6 mal 2,6 cm) ausgegossen. In dem erstarrten Agar werden zwei Auftragstellen (2,8 mm lichte Weite) für die elektrophoretisch zu untersuchende ungereinigte SAB-DNase ausgestanzt und 0,008 ml DNase mit einer Mikropipette eingefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung im Agargel erfolgt bei 180 Volt, 40mA Gleichstrom^x für 8 Objektträger in zwei Elektrophoresekammern (Dr.Bender und Hobein) bei einer Laufzeit von 2 Std.30 Min.. Nach Beendigung des Versuches wird der Mittelkanal ausgestanzt und mit 0,09 ml selbsthergestelltem Kaninchenantiserum gegen DNase gefüllt. (Siehe Seite 20)

Während der Aufbewahrung der Objektträger in einer feuchten Kammer bei 4°C für mindestens 2 Tage bildeten sich die Präzipitationslinien aus.

^x Das Regelgerät dankenswerterweise gebaut von Herrn Dr.D.Lang, Hyg.Inst. Ffm.

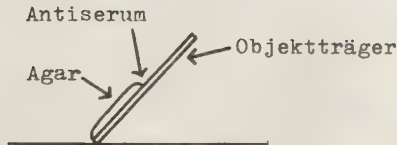
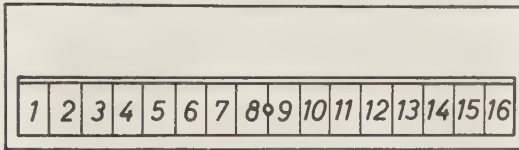


nach Crowle³ 1961

Nach der elektrophoretischen Auftrennung hat die Antigenfraktion gewöhnlich drei verschiedene Gestalten: rund, symmetrisch ellipsoid, asymmetrisch ellipsoid, indem sie entweder davor oder dahinter einen Schwanz bildet; die entsprechenden Präzipitationslinien sind halbkreisförmig, parabelförmig oder parabelförmig mit einem lang ausgezogenen Schenkel. Die Schärfe und Form des Präzipitationsbogens hängt von der Diffusion der Antigene und Antikörper ab, diese wiederum von der Konzentration und ihrem Molekulargewicht. Denn wenn das Antigen langsamer vom Ursprungsort diffundiert als sein entsprechender Antikörper, bildet sich die Präzipitationslinie schärfer aus, als wenn entgegengesetzte Bedingungen vorherrschen. Je näher die Linie am Kanal liegt, desto weiter ist das Antigen zum Kanal diffundiert. Ein lang ausgestreckter Bogen bildet sich durch ein Antigen aus, das aus Molekülen besteht, die eine verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit zeigen, wobei der Antigencharakter homogen ist, möglicherweise aber die Ladungsverhältnisse und andere Eigenschaften dieser Fraktion unterschiedlich sind. Typisch dafür z.B. ist die Kurve der Serumgammaglobuline. Es gibt Antigene, die bei der zweidimensionalen Diffusion nur eine einzige Präzipitationsbande entwickeln, aber bei der Immunelektrophorese sich in zwei und mehr verschiedene Fraktionen teilen. Wenn beide Fraktionen bei der Elektrophorese dicht zusammenbleiben, bildet jede Fraktion ihren eigenen Bogen, die Enden der Bögen verschmelzen miteinander. Also trennt die Immunelektrophorese manchmal die Banden schärfer auf.

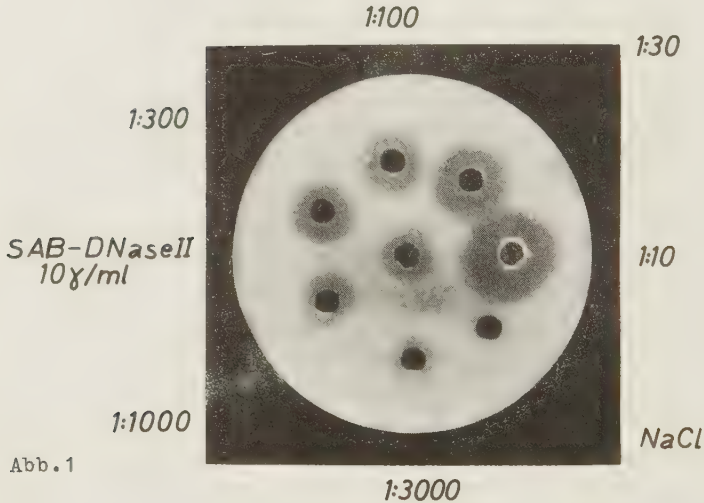
Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn die Auftragstelle so klein als möglich und rund ist. Bei einer ovalen Auftragstelle bilden sich abgeflachte Präzipitationslinien aus, die sich nur schwierig gegeneinander abgrenzen lassen.

f) Die Kombination der Immunelektrophorese mit dem
DNase-Nachweis mit Hilfe der DNA-Platte



Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird die auf einer Seite vom Mittelkanal befindliche Agarhälfte in 16 gleich große Blöckchen eingeteilt. (9 mal 4,5 mm, Höhe 1,5 mm) Dabei werden die Randzonen des Agars von 2 mm Breite verworfen. Der ursprüngliche Objektträger auf dem sich die andere Agarhälfte befindet, wird schräg gestellt und mit unverdünntem Antiserum versetzt. Die 16 Agarblöckchen werden 15 Minuten mit UV bestrahlt und anschließend auf die DNA-Platte gelegt zur Prüfung der Diffusion etwa vorhandener DNase im DNA-Agar. Der Versuch bietet eine gute Vergleichsmöglichkeit zwischen der Beziehung der DNase-Aktivitäten in der einen Agarsäule zu den Präzipitationslinien, die sich nach Antiserumzusatz in der anderen Agarsäule ausgebildet haben.

III. DIE ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNG



Die DNA-Platte dient zum Aktivitätsvergleich der durch Acetonfällung vorgereinigten SAB-DNase-haltigen Lösung mit der gereinigten SAB-DNase II^x.

Die Abb. 1 zeigt eine DNA-Platte (Plattendurchmesser 10 cm) mit 8 Löchern (Durchmesser 7 mm), um die messbare Höfe entstanden sind. (Siehe Seite 9, 1) In jedes Loch wurden 0,05 ml der zu untersuchenden Lösung pipettiert, die in einer Verdünnungsreihe wie in Abb. 1 angegeben mit NaCl (physiologischer Kochsalzlösung) angesetzt war. Die Höfe hängen in ihrem Durchmesser von der DNase-Konzentration der Lösungen ab. Die Größe des Hofes der zum Vergleich mitgeführten SAB-DNase II (gereinigt) 10 γ / ml entspricht dem Hof der vorgereinigten SAB-DNase bei einer Verdünnung von 1:1000.

^x Wir danken Herrn Dr. L. S. Cunningham und Herrn Prof. Dr. R. K. Zahn für das Präparat.

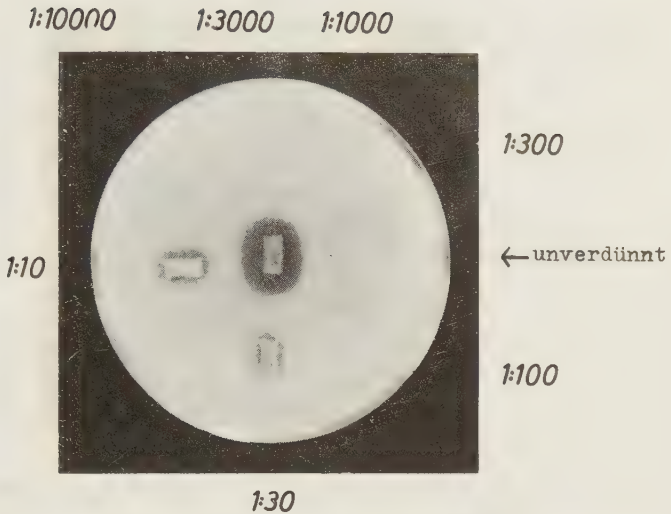


Abb.2

Aktivitätennachweis der vorgereinigten SAB-DNase-haltigen Lösung.

Die Abb.2 zeigt eine DNA-Platte mit aufgelegten Agarblöckchen. (Siehe Seite 9, 2) Der mittlere Hof wird hervorgerufen durch die Aktivität der unverdünnten SAB-DNase-haltigen Lösung, die Höfe um die äußeren Agarblöckchen durch ihre in Abb.2 angeführten Verdünnungsreihe.

Es wurden 0,01 ml der zu untersuchenden Lösung auf ein Agarblöckchen pipettiert.

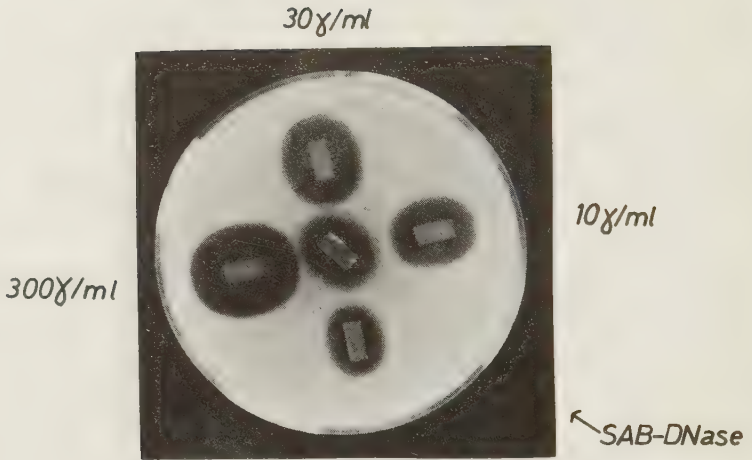


Abb. 3

3γ/ml
 Aktivitätenvergleich der Worthington-DNase I mit der
 SAB-DNase-haltigen Lösung.

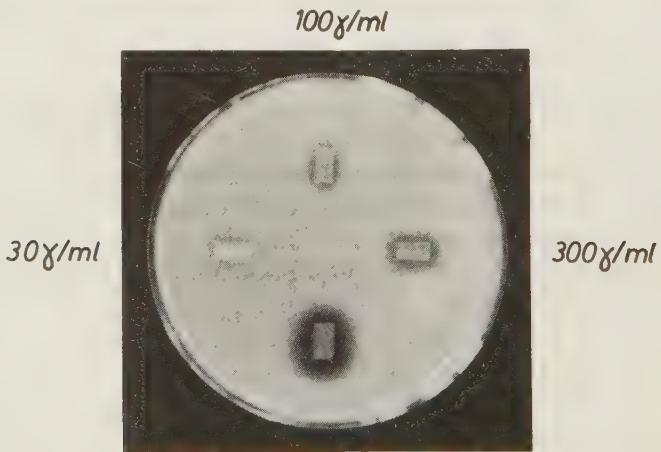


Abb. 4

SAB-DNase
 Aktivitätenvergleich der Cunningham-DNase II mit
 der SAB-DNase-haltigen Lösung.

Zum Vergleich der Aktivitäten der vorgereinigten SAB-DNase mit der Worthington-DNase I und der hochgereinigten Cunningham-DNase II wurden die folgenden Verdünnungsreihen benutzt. Die verschiedenen DNasen wurden in NaCl gelöst und verdünnt.

Worthington-DNase I (Abb.3)
(einmal kristallisierte Pankreas-DNase)

3 γ / ml
10 γ / ml
30 γ / ml
300 γ / ml

Cunningham-DNase II (Abb.4)

30 γ / ml
100 γ / ml
300 γ / ml

Zu Abb.3 : Der Hof, hervorgerufen von 0,01 ml Worthington-DNase I 10 γ / ml, entspricht dem Hof, erzeugt von 0,01 ml der unverdünnten selbsthergestellten SAB-DNase-haltigen Lösung (mittleres Blöckchen).

Zu Abb.4 : Der Hof, hervorgerufen von 0,01 ml Cunningham-DNase II 300 γ / ml, entspricht bei einem Vergleich mit Abb.2 dem Hof der SAB-DNase-haltigen Lösung bei einer Verdünnungsstufe von 1:30.

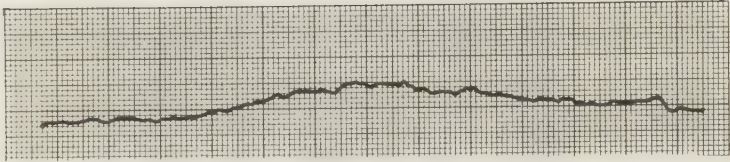


Abb.5a

Papierelektrophorese der SAB-DNase-haltigen Lösung

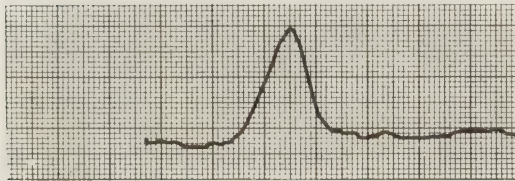


Abb.5b

Papierelektrophorese der Worthington-DNase I

4 mg DNase wurden in 0,2 ml Michaelispuffer pH=8,2 gelöst.

Es wurden auch Versuche mit der Papierelektrophorese durchgeführt um die verschiedenen DNasen nachzuweisen. Aufgetragene Menge 0,007 ml.

Die Cunningham-DNase konnte beim gewählten pH-Wert mit der Papierelektrophorese nicht nachgewiesen werden.

Die Gewinnung des
selbsthergestellten Kaninchenimmunserums.

Die bisher beschriebenen Versuche charakterisieren die Aktivität der SAB-DNase-haltigen Lösung, deren Antigennatur näher untersucht wurde. Zur Gewinnung spezifischer Antikörper wurden 6 Kaninchen immunisiert. Die DNase wurde im Verhältnis 1:1 mit einer 2%igen Aluminiumhydroxyd-Suspension vermischt und subcutan injiziert. Die Depotwirkung des Aluminiumhydroxyds steigert die Antikörperbildung.

Die Probeentnahme des Blutes erfolgte aus der Ohrvene der Kaninchen oder durch Herzpunktion.

Bei allen Kaninchen traten nach den anfänglichen Injektionen Gewichtsverluste ein; sofern die Kaninchen überlebten, richteten sich nach dem Gewichtsanstieg und Allgemeinbefinden die Injektionsmengen. Wir verwendeten das Kaninchenimmunserum für den Diffusionstest unverdünnt. (Wunderly 1960)

Die auf Seite 20 angeführte Tabelle gibt eine Übersicht über die Kaninchenimmunisierung mit der DNase-haltigen Lösung.

Kanin- chen	Tage ¹⁾	Gewicht in Gramm	Injek- tions- menge in ml	Blut- entnahme in ml	Zahl der Linien bei der Immunelek- trophorese		beim Ouchterlony- Test
Nr. 1	1	2930	1				
	22	2800	0,5				
	38	2480		2	1	Abb.7a	
	48	2610					
	58	2730	0,7	2	2	Abb.7b	
	66	2620		2	5	Abb.7c	
	104	2634	1				
	114	2576					1 Abb.6a
	167	2898	1				
	183	2900	1				
	190	2890	1				
	200	2900		10	9	Abb.7d	5 Abb.6b
Nr. 2	1	2538	0,5				
	13	2350					
	17	2320					
	23	2380	1				
	31	2240					
	69	2212	1				
	79	2298		3	2	Abb.8	
Nr. 3	1	2982	1,5				
	10	2830	1				
	18	2718					
	56	2772	1				
	119	3186	1				
	135	3300	1				
	142	3300	1				
	146	3300		10	5	Abb.9	
Nr. 4	1	2614	1				
	10	2574	1				
	18	2420					
	56	2472	0,5				
	156	3200	2				
	161	3314	2				
	167	3240					
	178	3374	2,5				
	186	3300					
	192	3216					
	199	3392					
	213	3300	2,5				
	220	3442		10	9		

¹⁾ Zeitangabe über die Antigeninjektionen und
über die Gewinnung der Immunsereen.

Ouchterlony-Plattentest

Versuchsreihe mit dem Antiserum Nr.1 (siehe Seite 20)

Die Antikörperzunahme im Kaninchenserum während der Immunisierung wird deutlich durch den Ouchterlony-Test gezeigt.



Abb. 6a

114 Tage nach der 1. Injektion



Abb. 6b

200 Tage nach der 1. Injektion

Abb. 6a zeigt 1 Präzipitationslinie, Abb. 6b ein breites Präzipitationsband an den Enden mit einer Aufsplitterung in 5 Präzipitationslinien.

ImmunelektrophoreseVersuchsreihe mit dem Antiserum Nr.1 (siehe Seite 20)

Abb. 7a

38 Tage nach der 1. Injektion

Der Versuch zeigt die erste mit dieser Methode nachweisbare Präzipitationslinie. Nach einer Laufzeit von ungefähr 1 Stunde wurde die halbmondförmige Ausfällung X vor Zugabe des Immunserrums sichtbar.



Abb. 7b

58 Tage nach der 1. Injektion

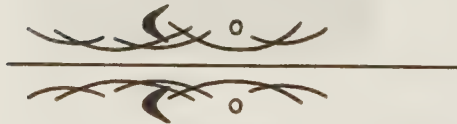


Abb. 7c

66 Tage nach der 1. Injektion

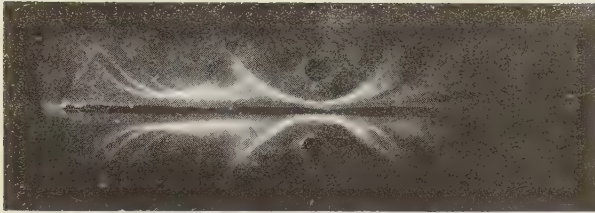


Abb.7d

200 Tage nach der 1.Injektion

Das Antiserum, gewonnen 200 Tage nach der 1.Antigeninjektion, lieferte 9 Präzipitationslinien. (Abb.7d) Nach dem Auftreten der 5 Präzipitationslinien (Abb.7c) ungefähr am 70. Tag wurde in der Immunisierung eine Pause von 2 Monaten eingelegt. Nach dieser Zeit gelang mit der Immunelektrophorese kein Antikörpernachweis mehr. (Forssman 1938 immunisierte in ähnlicher Weise Kaninchen. Die Immunität wurde 17 Tage nach der Vaccination manifest, nahm dann ab und verschwand 2 Monate später.) Nach der Pause injizierten wir dem Kaninchen innerhalb von 30 Tagen 3 ml der als Antigen dienenden DNase-haltigen Lösung. Jetzt trat keine allmähliche, sondern eine sprunghafte Zunahme des Antikörpergehaltes ein, sodaß 10 Tage nach der letzten Injektion 9 Präzipitationslinien auftraten. (Booster Effekt)

Versuchsreihe mit dem Antiserum Nr.2



Abb.8

79 Tage nach der 1.Injektion

Versuchsreihe mit dem Antiserum Nr.3

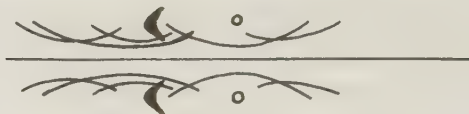


Abb.9

146 Tage nach der 1.Injektion

Versuchsreihe mit dem Antiserum Nr.4

Annähernd das gleiche Ergebnis wie das Antiserum Nr.1 brachte das Antiserum Nr.4. 220 Tage nach der 1.Immunisierung traten 9 Präzipitationslinien auf.

Nachdem die Antigennatur der DNase-haltigen Lösung nachgewiesen und näher charakterisiert worden war, wurde die Beziehung der Bakterien-DNase zu den präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexen untersucht. (Siehe Seite 13, f)

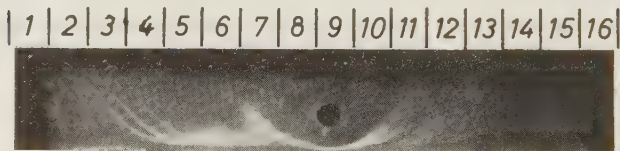


Abb.10a

Immunelektrophorese der SAB-DNase-haltigen Lösung mit dem Antiserum Nr.1 (gewonnen 200 Tage nach der 1.Injektion.)

Die auf der anderen Seite des Mittelkanals befindliche Agarhälfte wurde nach der elektrophoretischen Wanderung der SAB-DNase vor Zugabe des Immunserums in 16 Agarblöckchen geteilt und auf die DNA-Platten gelegt. (Abb.10b und 10c)

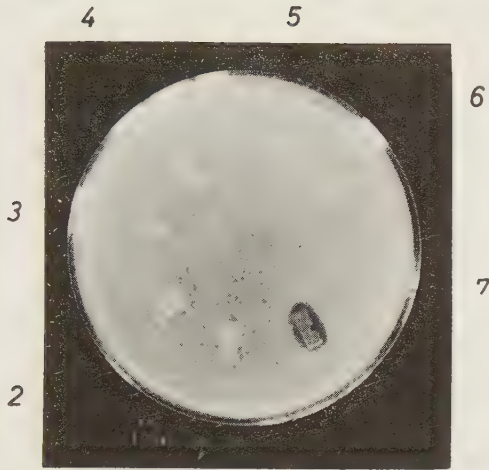


Abb. 10b



Abb. 10c

Die 16 Agarblöckchen wurden auf 2 DNA-Platten verteilt. Nachgewiesen wird die elektrophoretische Wanderung der SAB-DNase im Agargel und beim Vergleich mit Abb. 10a ihre Beziehung zu den präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexen.

Es bilden sich auf den DNA-Platten (Abb.10b und 10c) Höfe bei den Blöckchen 8-14 mit einer maximalen Größe bei 12 und 13. Der pH-Wert des Michaelispuffers in den Elektrophoresekammern beträgt 8,2; der isoelektrische Punkt der Staphylokokken-DNase wird mit 8,6 angegeben, das Enzym besitzt folglich einen Überschuß an negativen Ladungen, sodaß es in Richtung der Anode wandert, was mit dem Befund bei Abb.10c übereinstimmt.

Die folgenden Versuche lassen erkennen, daß man der DNase, die im Bereich von 8-14 nachgewiesen wird, keine Präzipitationslinie dieses Gebietes zuweisen kann.

Kaninchenantiserum Nr.1 und die DNase-haltige Lösung werden zu gleichen Teilen gemischt. In ein Reagenzglas gibt man eine abgemessene Menge DNase und überschüttet sie mit der gleichen Serummenge. Dieses Gemisch wird kräftig geschüttelt, über Nacht bei 4°C stehen gelassen und dann scharf zentrifugiert.

(3000 Touren/Min.) Der Überstand wird für die Versuche benutzt, das Sediment verworfen.

Zusammensetzung der 4 Mischungen, die bei dem Versuch Abb.11 benutzt wurden:

Nummer des Blöckchens auf der DNA-Platte	Verdünnungsreihe des Immunserums hergestellt mit NaCl-Lösung	Verdünnungsreihe des Immunserums im Überstand
1	unverdünntes Antiserum	1 : 2
2	1 : 10	1 : 20
3	1 : 50	1 : 100
4	1 : 100	1 : 200

Die DNase besitzt danach, auch nach dem Versuch ihrer Ausfällung in allen 4 Mischungen die gleiche Aktivität.

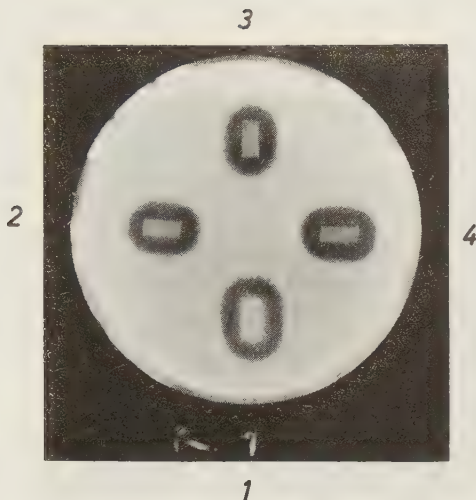


Abb.11

Aktivitätennachweis der SAB-DNase-haltigen Lösung nach Mischung mit dem spezifischen Kaninchenimmuns-
serum.

Abb.11 zeigt eine DNA-Platte mit aufgelegten Agarblöckchen, auf jedes Blöckchen wurde 0,01 ml von den 4 Überständen pipettiert. Der größte Hof bildet sich um das Blöckchen Nr.1 aus, wo in der aufgetragenen Lösung am meisten Antiserum vorhanden war. Die übrigen etwas kleineren Höfe besitzen annähernd die gleiche Größe. Da die Höfe nicht größer werden bei Abnahme der Antikörper tritt keine sichtbare Bindung zwischen Antigen und Antikörper mit dieser Methode auf. Der Versuch ergibt hier, daß das Kaninchenimmuns-
serum die DNase nicht hemmt, folglich ist das Enzym mit der Immunelektrophorese auch nicht nachweisbar.

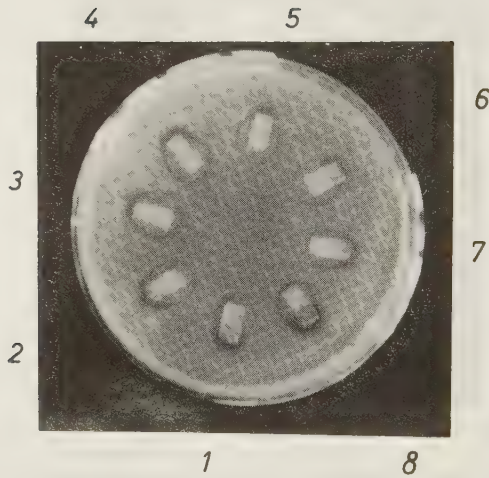


Abb. 12a

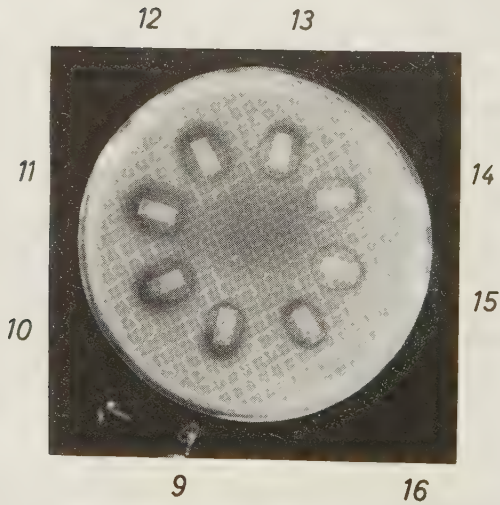


Abb. 12b

DNase-Nachweis nach Ausbildung der Präzipitationslinien bei der Immunelektrophorese.

Die 16 Agarblöckchen (Abb.12a und 12b) wurden aus der Agar-schicht erst nach Ausbildung der Präzipitationslinien hergestellt. Bei allen Blöckchen sind Höfe zu erkennen. An der zum Kanal gewandten Seite der Agarblöckchen, innere Schmalseite, zeigen sich die typischen Höfe, die durch den DNase-Gehalt des Antiserums hervorgerufen wurden, an der vom Kanal abgewandten Seite der Blöckchen, äußere Schmalseite, erkennt man die deutlicheren Diffusionshöfe der Staphylokokken-DNase im DNA-Agar. Die mangelnde Hemmung der DNase durch das Antiserum wird auch in diesem Versuch veranschaulicht.

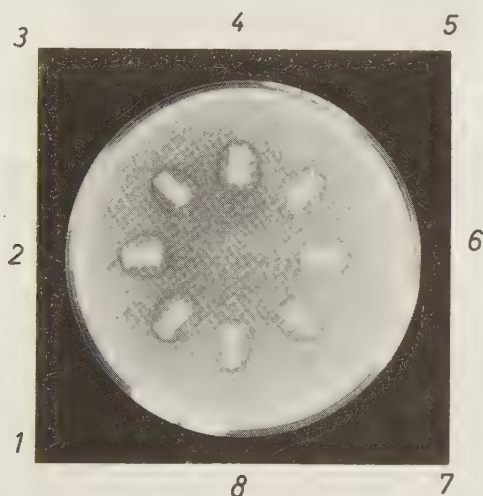


Abb.13

Im Agargel diffundierendes Kaninchenimmenserum :
Nachweis der serumeigenen DNase.

Die DNA-Platte mit den Blöckchen 9-16 erbrachte das gleiche Ergebnis wie Abb.13.

Zu Abb.13 : In einem normal vorbereiteten Objektträger wird der Mittelkanal ausgestanzt und mit 0,09 ml Antiserum angefüllt. Der Objektträger wird 2 Tage in einer feuchten Kammer aufbewahrt, dann wird die eine Agarschicht in 16 Blöckchen geteilt und nach dem schon beschriebenen Verfahren auf die DNA-Platte gelegt. Es bildet sich um jedes Blöckchen, sowohl kanalwärts als auch an der kanalabgewandten Seite, ein schmaler Hof aus, der wohl von der serumeigenen Kaninchen-DNase herrührt. Die Auswertung der Höfe ist deshalb erschwert, weil durch die Salzsäurepräzipitation auch Serumproteine mit ausgefällt werden. Der Ort ihres Niederschlages befindet sich im Inneren des schmalen, ringförmigen Hofes, wie es Abb.13 zeigt.

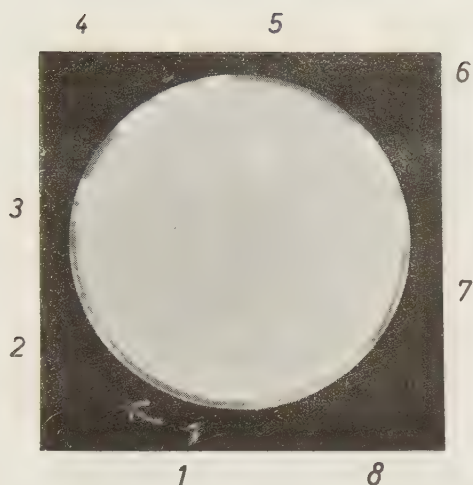


Abb. 14a

Das Kaninchenantiserum wurde elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluß daran, der Nachweis der serumeigenen DNase-Aktivität geführt. Es sind Höfe bei Blöckchen 4, 5, 6 und 7 zu erkennen, die übrigen von 9-16 sind negativ.

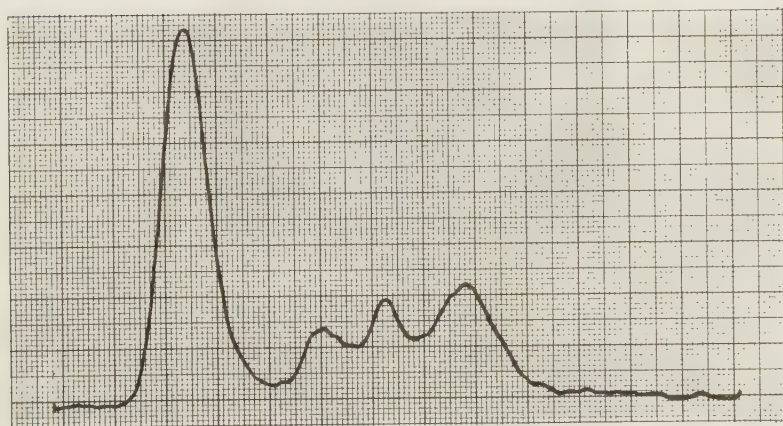


Abb. 14b

Papierelektrophorese des Kaninchenimmunserums
(aufgetragene Menge 0,007 ml).

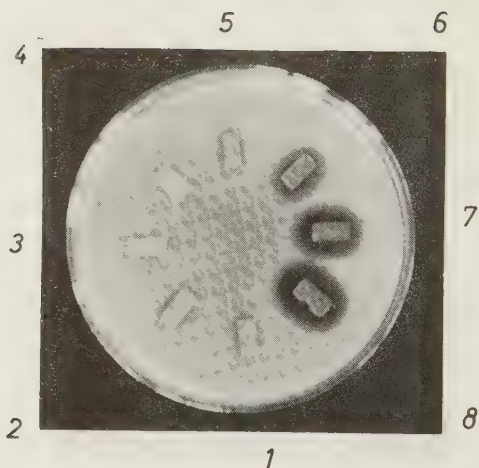


Abb. 15a

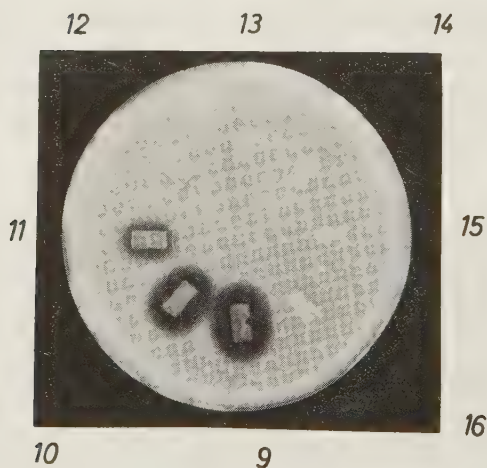


Abb. 15b

Aktivitätennachweis der Worthington-DNase I nach der elektrophoretischen Wanderung im Agargel.

Die Worthington-DNase I (aufgetragene Menge 0,008 ml) diffundiert während der elektrophoretischen Auftrennung im Agargel ziemlich gleichmäßig in Richtung der Anode und Kathode. Insgesamt findet man Höfe von Blöckchen 6-11 mit einem Konzentrationsmaximum bei 8 und 9.

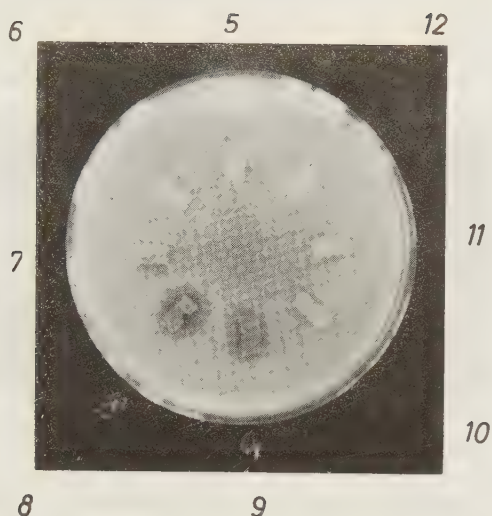


Abb. 16

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Cunningham-DNase II (0,008 ml) wird ihre Diffusion im Agargel durch Auflegen der Agarblöckchen auf die DNA-Platte überprüft. Es treten kleine Höfe bei Blöckchen 7-10 auf.

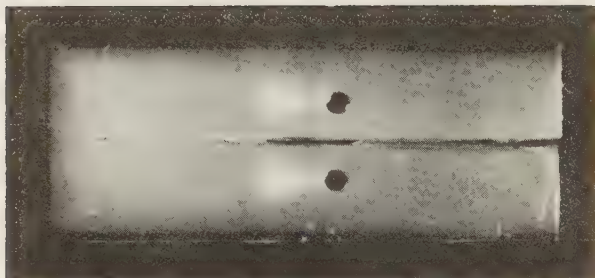


Abb.17

Ausfällung der Worthington-DNase I nach der elektrophoretischen Wanderung im Agargel (aufgetragene Menge 0,008 ml) mit Sulfosalicylsäure.

Versuchsbeschreibung: Der Objektträger wurde nach der Elektrophorese in 10%ige Sulfosalicylsäure gelegt und nach 5 Minuten mit aqua bidest. nachgewaschen.

Nach der elektrophoretischen Wanderung im Agargel wurde die Ausfällung der SAB-DNase-haltigen Lösung mit Sulfosalicylsäure verglichen mit einer 1%igen Worthington-DNase I (Abb.17) und einer 1%igen Cunningham-DNase II, wobei die beiden DNasen in Michaelispuffer pH=8,2 gelöst wurden. Die Worthington-DNase I zeigte als einzige ein Präzipitat, das in Richtung der Kathode gewandert war, im Gegensatz zur Cunningham-DNase I und der SAB-DNase-haltigen Lösung, die keine sichtbaren Ausfällungen ergaben.

IV. DISKUSSION

Der zweidimensionale Plattendiffusionstest und die Immunelektrophorese wurden benutzt zur Analyse einer durch Acetonfällung vorgereinigten SAB-DNase-haltigen Lösung, wobei besondere Aufmerksamkeit auf eines ihrer Enzyme, die DNase, gelenkt wurde. Die DNase, die sowohl extra- als auch intrazellulär vom SAB-Stamm unter gewissen Bedingungen produziert wird, kann optimal aktiviert werden in Gegenwart von $0,01 \text{ mol Ca}^{++}$ und einem schwach alkalischen pH-Wert; ihr isoelektrischer Punkt beträgt nach der Dialyse 8,6. Sie katalysiert den Abbau des DNA-Moleküls (Crick 1957, Engström und Pineau 1958, Karlson 1961) und durch diese Eigenschaft kann mit verschiedenen Methoden ihre Aktivität bestimmt werden. Dazu benutzten wir eine Nähragarplatte mit 0,1% DNA-Zusatz (DNA-Platte), die bisher nur von Heinecke und Venner 1958 beschrieben und noch nicht für die DNase-Aktivität routinemäßig eingesetzt wurde, anstatt der bisher üblichen und meist angewandten Methoden der Viskositätsmessung und UV-Absorptionsmessung.

Gewonnen wurde die DNase aus einer Bakterienkultur nach einer Abwandlung des Verfahrens von Cunningham, Catlin und de Garilhe 1956. Die Aktivität dieser selbsthergestellten, vorgereinigten DNase-haltigen Lösung wird bestimmt durch ihre Diffusion in einer DNA-Platte und verglichen mit der Aktivität der hochgereinigten Worthington-DNase I und Cunningham-DNase II.

Durch die Kombination der Immunelektrophorese mit der DNA-Platte sollte auch die Beziehung der Bakterien-DNase zu den präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexen gefunden werden. (Abb. 10a, 10b, 10c und Versuchsbeschreibung Seite 13, f).

Die mit der SAB-DNase-haltigen Lösung immunisierten Kaninchen reagierten in günstigen Fällen mit einer unterschiedlichen Antikörperbildung. Sichtbar gemacht wurde diese Antikörperreaktion durch die Präzipitationslinien im Ouchterlony-Platten-test und mit Hilfe der Immunelektrophorese. (Abb. 6a, 6b und 7d) Es ergab sich, daß diese Lösung bis zu 9 nachweisbare Antigene

enthält, gegen die das Kaninchen immunisiert wurde. Die Untersuchungen zielten auf eine Methode zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms in Verbindung mit dem Nachweis seiner Antigenatur mit der Immunelektrophorese. Als Grundversuch kann man den Ouchterlony-Test betrachten; dabei werden Präzipitationslinien auf einem begrenzten Raum gebildet, die durch die Immunelektrophorese auseinandergezogen werden.

Man findet Beispiele bei einigen Autoren, die mit der zweidimensionalen Diffusion und der Immunelektrophorese Staphylokokkenenzyme oder komplexe Antigene anderer Bakterien nachgewiesen haben. (Elek und Levy (a) 1950, Sargalla, Bergdoll, Dack 1952, Grabar und Williams 1955, Halbert 1958)

Daß die DNase beim *Staphylococcus aureus* bezüglich der Virulenz eine Bedeutung hat, zeigt die Zusammenstellung von Burns und Holtman 1960: dabei treten Koagulase und Desoxyribonuclease häufig gemeinsam auf und sind bei pathogenen Stämmen mit weiteren Enzymen vergesellschaftet.

Es gelang uns nicht die Präzipitationslinien bei der Immunelektrophorese mit einer DNase-Aktivität in direkten Zusammenhang zu bringen.

Wie weit die Acetonfällung bei der Gewinnung der SAB-DNase-haltigen Lösung eine Reinigung darstellt, läßt sich nicht sagen; andererseits treten zwar bis zu 9 Präzipitationslinien auf, jedoch ohne eine Verringerung der DNase-Aktivität. Dies zeigte auch schon der Versuch, die DNase-haltige Lösung mit Antikörpern reagieren zu lassen, wobei sich kein brauchbares Resultat ergab. (Abb.11) Ganz allgemein kann man wohl sagen, daß die DNase kein rasch und deutlich antikörperbildendes Antigen darstellt. Nach den vorliegenden Versuchen hat es den Anschein, daß auch in Gegenwart von Antikörpern kein Aktivitätsverlust vorhanden ist. Auf der anderen Seite ist die DNA-Platte wohl ein empfindlicher Test, wie auch schon Heinecke und Venner nachwiesen. Bei den Versuchen mit der hochgereinigten Worthington-DNase I erhält man noch bei 3 γ /ml (aufgebrachte Gesamtmenge 0,01 ml) deutlich messbare Höfe. (Abb.3) Schon bei der nicht vollständig gereinigten Cunningham-DNase II

waren die Höfe bedeutend kleiner. (Abb.4) Wie weitere Versuche ergaben, konnte bis 0,2 γ / ml eine DNase-Aktivität noch gefunden werden, diese Aktivitäten lassen sich auch quantitativ nachweisen.

Es können aber diese Rohpräparate, wie z.B. die nur durch Acetonfällung vorgereinigte SAB-DNase-haltige Lösung, durchaus höhere Konzentrationen von Hemmstoffen (Proteine und Ribonucleinsäure) enthalten. Dies wurde von Bernheimer 1953 gefunden, jedoch hat man bei einem qualitativen Vergleich der DNase Wirkung mit und ohne Elektrophorese den Eindruck, daß bei der Elektrophorese Hemmstoffe nicht abgetrennt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Kultur von *Staphylococcus aureus* SAB (Cunningham, Catlin und de Garilhe 1956) wurde eine Desoxyribonuclease (DNase) und weitere Bestandteile in einem ersten Reinigungsschritt durch Acetonfällung gewonnen.

Durch die Immunelektrophorese und den Nachweis der DNase auf einer DNA-haltigen Agarplatte wurden folgende Ergebnisse erbracht:

1. Aktivitäts- und elektrophoretischer Vergleich von Worthington-DNase I und Cunningham-DNase II mit dem selbsthergestellten SAB-DNase-haltigen Material ergaben Unterschiede.
2. Es traten bis zu 9 Präzipitationslinien bei der Immunelektrophorese mit einem ebenfalls selbsthergestellten Kaninchenimmunserum auf.
3. Die Wanderung der DNase-Aktivität erfolgte zur Anode (pH=8,2).
4. Die immunelektrophoretischen Präzipitationslinien lassen sich mit der DNase-Aktivität auf der DNA-Platte nicht korrelieren, weil die DNase-Konzentration niedrig im Vergleich mit der hohen Empfindlichkeit der DNA-Platte als Enzymnachweis war.

LITERATUR

- Alexander, M.,
Heppel, L.A. u.
Hurwitz, J. J. Biol. Chem. 236, 3014-3018 (1961):
The purification and properties of
micrococcal nuclease.
- Allison, V.D. Proc. roy. Soc. Med. 42, 214-220 (1949):
Discussion on food poisoning
- Bernheimer, A.W. Biochem. J. 53, 53-56 (1953):
Differentiation of ribonucleic acids
by inhibition of streptococcal
deoxyribonuclease.
- Borenfreund, E. u.
Bendich, A. J. Biophysic. and Biochem. Cytol.
9, 81-91 (1961):
A study of the penetration of mammalian
cells by deoxyribonucleic acids.
- Burns, J. u.
Holtman, D.F. Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 1115-1124 (1960):
Biochemical properties of virulent and
avirulent staphylococci.
- Catlin, B.W. u.
Cunningham, L.S. J. gen. Microbiol. 19, 522-539 (1958):
Studies of extracellular and intra-
cellular bacterial deoxyribonucleic
acids.
- Crick, F.H.C. A symposium on the chemical basis of
heredity
Mc Elroy, W. and Glass, B., Baltimore 1957
The Johns Hopkins Press
532-538: The structure of DNA.

- Crowle, A.J. Immunodiffusion. Academic Press
New York and London (1961)
- 1) 143-144: Applications of immunodiffusion.
 - 2) 60-86: Double diffusion.
 - 3) 86-93: Immuno-electrophoresis.
- Cunningham, L.S. Ann.N.Y.Acad.Sci. 81, 788-791 (1959):
Micrococcal nuclease and some products
of its action.
- Cunningham, L.S., J.Amer.Chem.Soc. 78, 4642-45 (1956):
Catlin, B.W. u. A.deoxyribonuclease of micrococcus
Privat de Garilhe, M. pyogenes.
- Darányi, J. Arch.Hyg. 139, 3-11 (1955):
Infektionsmechanismus und Epidemiologie
bei den Staphylokokken.
- Delaunay, A. u. C.R.Soc.Biol.(Paris) 139, 363-364
Lasfargues, E. (1945):
Sur le pouvoir nécrosant de l'exotoxine
staphylococcique et de l'endotoxine
typhique, observé comparativement in
vivo et in vitro.
- Duthie, E.S. u. Nature (Lond.) 165, 729-730 (1950):
Lorenz, L. Staphylococcal coagulase: the nature
of plasma activator in the clotting
process.
- Elek, S.D. u. Brit.J.exp.Path. 31, 358-368 (1950):
Levy, E.(a) Diffusible antigens in staphylococcal
cultures.
- Elek, S.D. u. J.Path.Bact. 62, 541-554 (1950):
Levy, E.(b) Distribution of haemolysins in patho-
genic and non-pathogenic staphylococci.

- Elek, S.D. Staphylococcus pyogenes and its relation to disease
E. and S. Livingstone Ltd. Edinburgh, London (1959)
- 1) 246-248: The distribution of haemolysins in pathogenic staphylococci.
 - 2) 257-265: Dermonecrototoxin.
 - 3) 296-312: Enterotoxin.
 - 4) 287-289: Proteases.
 - 5) 178-218: Staphylocoagulase.
 - 6) 290: Lipase.
 - 7) 271-279: Hyaluronidase.
- Engström, A. u. Biological Ultrastructure.
Finean, J.B. Academic Press, New York (1958)
260-272: Role of nucleic acids.
- Forssman, J. Acta path. microbiol. scand.
15, 396-425 (1938):
Studies in staphylococci. A further contribution to the understanding of the immunity to staphylococci.
- Grabar, P. Behringwerk-Mitteilungen
35, 19-32, (1958):
Die Entstehung der Antikörper.
- Grabar, P. u. Masson, Paris (1960):
Burtin, P. L'analyse immunoélectrophorétique
- Grabar, P. u. Biochem. Biophys. Acta 10, 193-194 (1953):
Williams, C. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétique et immunochimiques d'un mélange de protéines

- Grabar, P. u.
Williams, C. Biochem. Biophys. Acta 17, 67-70 (1955):
Méthode immuno-électrophorétique
d'analyse de mélanges de substances
antigéniques.
- Grün, L. Ergebnisse der Mikrobiologie, Immuni-
tätsforschung und experimentellen
Therapie. 31, 130-169 (1958):
Alte und neue Probleme der
Staphylokokken.
- Halbert, S.P. J. Exptl. Med. 108, 385-410 (1958):
The use of precipitin analysis in agar
for the study of human streptococcal
infections. The purification of some
of the antigens detected by these
methods.
- Heinecke, H. u.
Venner, H. Z. Naturforschg. 13b, 576-579 (1958):
Quantitative Bestimmung von Nucleasen
2. Mitteilung DNasen.
- Hirschfeld, J. Science Tools 7, 18-25 (1960):
Immuno-electrophoresis.
- Hitzig, W.H. Schweiz. med. Wschr. 51, 1449-1452 (1960):
Praktische und theoretische Ergebnisse
neuerer Bluteiweißkörperuntersuchungen.
- Joiris, E. Rev. méd. Liège 8, 11-15 (1953):
Les intoxications alimentaires d'origine
staphylococcique.
- Kaffka, A. Zbl. Bakt. I. Orig. 168, 381-385 (1957):
Erfahrungen mit einfachen Untersuchungs-
methoden zum Nachweis von Hyaluronidase,
Fibrinolysin und Phosphatase bei
Staphylokokken.

- Karlson, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme Verlag Stuttgart (1961) 89-111: Nucleinsäuren und Protein-Biosynthese.
- Kleinschmidt, A.K. u. Z.Naturforschg. 14b, 770 (1958):
Zahn, R.K. Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln in Proteinmischfilmen.
- Kolle, W., Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten.
Hetsch, H. u. 11. Aufl. Verlag Urban und Schwarzenberg, München, Berlin (1952)
Schloßberger, H. 210-220: Staphylokokken-Infektionen.
- Michaelis, L. u. Z.Immunforschg. 36, 449-463 (1923):
Nakahara, Y. Die fettsplattenden Fermente der Bakterien.
- Oeding, P. Acta path.microbiol.scand.
 33, 312-323 (1953):
 Serological typing of staphylococci. Investigations on the serological, chemical, and physical properties of the antigens.
- Otte, H.J. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie und Infektionskrankheiten. Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1961) 176-183: Grampositive Kokken.
- Pöhn, H.P. Zbl.Bakt.I.Orig. 164, 164-172 (1955):
 Die Differenzierung von Staphylococcus aureus mittels Bakteriophagen.
 168, 533-541 (1957): Die Spezifität der Typenphagen für die einzelnen Staphylokokken-Gruppen.

- Richou, R.,
 Richou, M. R.,
 Gerbeaux, G.,
 Jaquet, J. u.
 Julienne, R.
- C.R.Soc.Biol.(Paris) 146, 1493-1494 (1952):
 Recherches sur les diastases microbiennes. Rapports entre le pouvoir gélatinolytique et les autres propriétés des filtrats de culture de staphylocoques isolés de la mamelle des Bovidés.
- Rogers, H. J.
- The bacteria a treatise on structure and function.
 J.C.Gunsalus, R.Y. Stanier Vol.II.
 Academic Press New York and London (1961)
 309-310: Deoxyribonuclease of Staphylococcus aureus.
- Rountree, P. M. u.
 Barbour, R. G. H.
- Austral. Ann. Med. 1, 80-83 (1952):
 Antibody to the erythrocyte coating polysaccharide of staphylococci: its occurrence in human sera.
- Scheidegger, J. J.
- Int. Arch. Allergy, N. Y. 7, 103-110 (1955):
 Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
- Schmidt, H.
- Fortschritte der Serologie.
 2. Aufl. Verlag Dr. Dietrich Steinkopff Frankfurt/M. (1955)
 28: Serumeiweißkörper.
- Schultze, H. E. u.
 Schwick, G.
- Behringwerk-Mitteilungen
33, 11-36 (1957):
 Immunelektrophoretische Studien.

- Williams, Jr., C.A. u.
Grabar, P. J.Immunol. 74, 158-167 (1955):
Immuno-electrophoretic studies of serum
proteins. The antigens of human serum.
397-403: Immune sera: antibody
distribution.
404-410: Human gamma globulin.
- Wuhrmann, F. u.
Wunderly, C. Die Bluteiweißkörper des Menschen.
Benno Schwabe & Co. Verlag Basel (1957)
- Wunderly, C. Dtsch.med.Wschr. 83, 407-410 (1958):
Die Immunelektrophorese.
- Wunderly, C. u.
Bustamante, V. Klin.Wschr. 35, 758-760 (1958):
Eine verbesserte Technik der Elektro-
phorese im Agargel.
- Wunderly, C. Composition, structure and reactivity
of proteins. A laboratory manual of
analytical methods of protein chemistry
(including polypeptides)
Vol.2. Alexander, P., Block, R.J.,
Pergamon Press Oxford, London, New York,
Paris (1960)
232-243: The technique of immu-
nophoresis in agar-gel.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. A. K. K l e i n s c h m i d t, Professor am Hygiene-Institut, für die Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise und Anregungen bei der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des elektronenmikroskopischen Laboratoriums im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt/M. (Direktor Prof. Dr. med. K. Herzberg) für die freundliche Unterstützung bei meinen Versuchen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel
„ Immunelektrophoretische Versuche zum Nachweis von Desoxyribonucleaseaktivitäten aus *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (SAB) “
im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt/Main unter Leitung von
Prof. Dr. A. K. K l e i n s c h m i d t
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hanau/Main, den 14. März 1963.

Gertrud Rausch

Mein Lebenslauf!

Ich wurde am 13.Juni 1937 in Secovce (CSR) als Tochter des Steueroberinspektors Emil Rausch und dessen Ehefrau Gertrud geboren. Nach der Ausweisung aus der CSR im Jahre 1946 besuchte ich in Hanau/Main das Realgymnasium für Mädchen und erwarb am 15.März 1957 das Zeugnis der Reife. Im Wintersemester 1957/58 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main und legte im Sommersemester 1963 an dieser Universität mein Staatsexamen ab.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Prof. Dr. A. K. Kleinschmidt

Prof. Dr. J. v. Reckow

Prof. Dr. M. Kuck

Prof. Dr. P. Hauser

Dr. W. Koller

Prof. Dr. W. Sandritter

Prof. Dr. E. Westermann

Prof. Dr. G. K. Steigleder

Prof. Dr. H. Martin

Privatdozent Dr. W. Ristow

Privatdozent Dr. W. Weber

Prof. Dr. D. Starck

Prof. Dr. K. Wezler

Prof. Dr. E. Heinz

